

KEPEKAAN BEBERAPA ISOLAT LOKAL *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* TERHADAP ANTIBIOTIKA

SUTIASTUTI WAHYUWARDANI dan SOERIPTO

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 28 Oktober 1997)

ABSTRACT

WAHYUWARDANI, S. and SOERIPTO. 1998. Sensitivity of some local isolates of *Mycoplasma gallisepticum* against antibiotics. *Journal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (1): 47-51.

Sensitivity of five local isolates of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) strain and two standard MG isolates obtained from Australia were tested against antibiotics of oxytetracycline, doxycycline, erythromycin, bacitracin, vancomycin, methicillin and penicillin using antibiogram disc method. The result showed that one, 2 and 3 local MG isolates were resistant to doxycycline, erythromycin and oxytetracycline respectively. MG isolate of ADA7 from Australia was found to be resistant to all antibiotics tested. None of the local MG isolates were sensitive against bacitracin, vancomycin, methicillin and penicillin.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, antibiogram disc

ABSTRAK

WAHYUWARDANI, S. dan SOERIPTO. 1998. Kepekaan beberapa isolat lokal *Mycoplasma gallisepticum* terhadap antibiotika. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (1): 47-51.

Lima isolat lokal galur *Mycoplasma gallisepticum* (MG) dan dua isolat MG standar yang diperoleh dari Australia diuji kepekaannya terhadap antibiotika oksitetrasiklin, doksisisiklin, eritromisin, basitrasin, vankomisin, metisilin dan penisilin dengan menggunakan metode kertas cakram antibiogram. Hasil uji memperlihatkan bahwa satu, 2 dan 3 isolat lokal MG masing-masing resisten terhadap doksisisiklin, eritromisin dan oksitetrasiklin. Isolat MG ADA7 yang diperoleh dari Australia ditemukan resisten terhadap semua antibiotika yang diuji. Tidak satupun isolat lokal MG yang diuji peka terhadap basitrasin, vankomisin, metisilin dan penisilin.

Kata kunci: *Mycoplasma gallisepticum*, cakram antibiogram

PENDAHULUAN

Infeksi *Mycoplasma gallisepticum* (MG) pada ayam dikenal sebagai *chronic respiratory diseases* (CRD) atau penyakit pernapasan menahun (PPM). Penyakit ini ditandai dengan gangguan pernapasan seperti batuk, bersin dan ngorok. Kondisi penyakit akan menjadi parah jika ada komplikasi dengan penyakit virus pernapasan lain seperti *Newcastle disease* (ND), bronkhitis infeksius (IB), laringotrakheitis infeksius (ILT) dan atau infeksi yang disebabkan oleh bakteri, terutama *E. coli* (YODER, 1991). PPM yang disertai dengan infeksi lain disebut kompleks PPM. Mortalitas akibat penyakit ini rendah jika tidak diikuti dengan infeksi lain, tetapi morbiditasnya tinggi (YODER, 1991). Pada infeksi yang kompleks, mortalitas menjadi tinggi.

Beberapa antibiotika dilaporkan dapat digunakan baik untuk pencegahan maupun pengobatan terhadap infeksi MG (YODER, 1991). Antibiotika golongan

makrolida dan tetrasiklin paling aktif melawan kuman MG (WHITHEAR, 1983). Namun, perlu disadari bahwa penggunaan antibiotika secara terus-menerus di lapangan untuk pencegahan atau pengobatan PPM pada ayam cenderung mengakibatkan penurunan kepekaan MG terhadap beberapa antibiotika, seperti yang dilaporkan oleh beberapa penulis sebelumnya (WHITHEAR *et al.*, 1983; LIN, 1987; TANNER dan WU, 1992). Uji kepekaan MG terhadap antibiotika perlu dilakukan secara rutin, terutama sebagai dasar untuk menentukan jenis antibiotika yang paling efektif untuk pencegahan atau pengobatan penyakit.

Uji kepekaan MG terhadap antibiotika secara *in vitro* pernah dilakukan oleh beberapa peneliti terdahulu (WHITHEAR *et al.*, 1983; TANNER dan WU, 1992; BRADBURY *et al.*, 1994; SOERIPTO, 1995) dengan menggunakan teknik *micro-broth dilution*, sedangkan JORDAN dan KNIGHT (1984), LIN (1987), SOERIPTO (1995) menggunakan *agar dilution test*. Uji kepekaan

MG terhadap antibiotika dengan menggunakan kertas cakram antibiogram pernah dilaporkan oleh BOUGHTON (1982). Teknik ini pernah digunakan di Indonesia, untuk melakukan uji kepekaan beberapa macam kuman terhadap antibiotika antara lain terhadap *Salmonella typhimurium* (SRI PURNOMO dan CHOTIAH, 1994), *Bacillus anthracis* (POERWADIKARTA *et al.*, 1993). Namun, sepanjang pengetahuan penulis, teknik ini belum pernah dilaporkan di Indonesia untuk uji kepekaan MG terhadap antibiotika. Oleh karena itu, dalam penelitian ini pengujian antibiogram untuk mengetahui kepekaan beberapa isolat lokal MG dicoba dilakukan dengan menggunakan kertas cakram sebagai alternatif pengujian yang lebih mudah dan sederhana.

MATERI DAN METODE

Isolat MG

Tujuh isolat MG dipergunakan dalam penelitian ini, yaitu: 5 isolat lokal MG (MG-88016, MG-77098, MG-85296, MG-96017 dan MG-76127), dan 2 isolat standar (MG-S6 dan MG-ADA7) yang diperoleh dari Australia. Sebelum dilakukan pengujian, semua isolat MG yang akan digunakan dimurnikan lebih dahulu dalam medium mikoplasma cair dan padat. Setelah tumbuh, masing-masing biakan dimasukkan ke dalam botol bijou's sebanyak 2 ml, kemudian disimpan di dalam freezer -20°C yang akan dipergunakan sebagai stok biakan kuman MG.

Medium mikoplasma

Medium mikoplasma yang digunakan adalah medium padat dan medium cair yang dibuat di laboratorium Balai Penelitian Veteriner yang merupakan modifikasi dari FREY *et al.* (1968).

Antibiogram

Antibiotika yang digunakan dalam uji antibiogram ini adalah: oksitetrasiklin 30 µg, doksisisiklin 30 µg, eritromisin 15 µg, basitrasin 10 units, vankomisin 30 µg, metisilin 5 µg dan penisilin G 10 units, yang semuanya merupakan produksi Oxoid.

Pengenceran biakan MG

Stok biakan MG yang akan digunakan dicairkan dalam penangas air dengan suhu 37°C. Sebanyak 200 µl biakan yang baru dicairkan ditanam ke dalam 2 ml medium mikoplasma cair, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C sampai terjadi perubahan warna medium dari merah menjadi merah kekuning-kuningan (pH 6,8). Ada tidaknya kontaminasi dapat diketahui dengan menginokulasikan biakan yang sama pada

medium padat mikoplasma atau medium agar darah. Setelah diketahui tidak ada kontaminasi pada medium kontrol tersebut, biakan pada medium mikoplasma cair yang sudah berubah warna dapat digunakan. Pengenceran berseri dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-10} dilakukan dengan cara memasukkan 200 µl biakan mikoplasma ke dalam 1.800 µl medium mikoplasma cair.

Penghitungan koloni mikoplasma

Sebanyak 150 µl medium cair dimasukkan ke dalam 96 sumuran pada lempeng mikrotiter dengan dasar sumuran berbentuk U buatan Linbro, kemudian setiap sumuran diisi dengan 25 µl biakan yang telah diencerkan dari 10^{-1} - 10^{-10} . Masing-masing enceran dimasukkan ke dalam 8 sumuran (A-H) yang masing-masing terdiri atas 12 kolom. Pengenceran 10^{-10} dimasukkan pada kolom 10, pengenceran 10^{-9} pada kolom 9 demikian seterusnya sampai pada kolom 1. Sementara itu, kolom 11 dan 12 untuk kontrol diisi medium mikoplasma cair tanpa biakan mikoplasma. Lempeng mikrotiter yang telah diberi biakan tersebut kemudian ditutup dengan pembungkus plastik, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C. Setelah diinkubasikan selama ± 5 hari, jumlah koloni dapat dihitung dengan menggunakan metode MEYNELL dan MEYNELL (1975). Jumlah koloni dinyatakan dalam CCU (*colour changing unit*).

Uji kepekaan MG terhadap antibiotika

Biakan MG yang telah diencerkan dari 10^{-1} s/d 10^{-3} masing-masing ditanam pada medium mikoplasma agar dengan cara menuangkannya secara merata pada permukaan agar, kemudian dibiarkan selama 5-10 menit dalam biohazard supaya permukaan agar tidak basah. Kertas cakram antibiogram diletakkan di tengah-tengah permukaan agar. Satu cawan petri agar berisi satu kertas cakram. Medium agar yang telah diberi kertas cakram tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C. Setelah pertumbuhan mikoplasma mencapai maksimal (± 3 hari), diameter zona hambat yang terbentuk dapat diukur. Diameter zona hambat diukur termasuk diameter kertas cakram (SIMMONS dan CRAVEN, 1980) dengan menggunakan penggaris. Penilaian kepekaan dilakukan menurut ketentuan National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (JONES, 1984).

HASIL

Tabel 1 memperlihatkan jumlah kuman masing-masing isolat MG yang dihitung setelah diinkubasikan selama 3-7 hari pada suhu 37°C. Jumlah koloni yang terendah adalah isolat MG-77098, yaitu $1,78 \times 10^7$ CCU/ml,

sedangkan jumlah koloni yang tertinggi adalah isolat MG-ADA7, yaitu $6,64 \times 10^9$ CCU/ml. Pada umumnya, isolat MG yang diuji memperlihatkan jumlah koloni sebesar 10^9 CCU/ml, kecuali isolat MG-88016 dan MG-77098 masing-masing sebesar 10^8 CCU/ml dan 10^7 CCU/ml.

Tabel 1. Kepadatan koloni *Mycoplasma gallisepticum*

Kode Isolat	CCU/mililiter
S6	$1,61 \times 10^9$
ADA7	$6,64 \times 10^9$
88016	$3,37 \times 10^8$
77098	$1,78 \times 10^7$
85296	$1,45 \times 10^9$
96017	$4,92 \times 10^9$
76127	$1,17 \times 10^9$

Semua isolat MG yang diuji memperlihatkan resistensi terhadap vankomisin, basitrasin, metisilin dan

penisilin. Kepekaan isolat MG terhadap oksitetrasiklin, doksisisiklin dan eritromisin bervariasi (Tabel 2).

Menurut ketentuan dari NCCLS (JONES, 1984) kuman termasuk peka terhadap antibiotika tertentu bila diameter zona hambat yang terbentuk untuk doksisisiklin 30 µg, oksitetrasiklin 30 µg dan eritromisin 15 µg masing-masing sebesar ≥ 16 mm, ≥ 19 mm dan ≥ 18 mm. Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 10^6 CCU/ml menunjukkan satu, 2 dan 3 isolat lokal MG masing-masing resisten terhadap antibiotika doksisisiklin, oksitetrasiklin dan eritromisin. Isolat luar MG-ADA7 tidak memperlihatkan kepekaan terhadap semua antibiotika yang diuji.

Dari semua antibiotika yang diuji tampak bahwa diameter zona hambatan makin menyempit dengan meningkatnya jumlah koloni MG yang diuji (Tabel 2). Pada konsentrasi 10^7 - 10^8 CCU/ml hanya 2, 1 dan 2 isolat lokal MG yang masing-masing sensitif terhadap doksisisiklin, oksitetrasiklin dan eritromisin.

Tabel 2. Diameter zona hambat yang dibentuk beberapa antibiotika terhadap MG (milimeter)

Antibiotika	Kepadatan isolat	S6	ADA7	88016	77098	85296	96017	76127
OT	10^8	*	10	*	*	12	12	13
	10^7	33	12	24	*	15	14	14
	10^6	38	12	34	12	18	20	15
	10^5	38	*	54	13	*	*	*
DO	10^8	*	8	*	*	12	10	14
	10^7	23	10	24	*	24	14	16
	10^6	40	10	30	19	26	16	18
	10^5	44	*	54	19	*	*	*
ER	10^8	*	0	*	*	14	16	0
	10^7	36	0	28	*	16	24	0
	10^6	55	0	43	18	16	35	0
	10^5	71	*	70	33	*	*	*
BA	10^8	*	0	*	*	0	0	0
	10^7	0	0	0	*	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0
	10^5	0	*	0	0	*	*	*
VA	10^8	*	0	*	*	0	0	0
	10^7	0	0	0	*	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0
	10^5	0	*	0	0	*	*	*
ME	10^8	*	0	*	*	0	0	0
	10^7	0	0	0	*	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0
	10^5	0	*	0	0	*	*	*
PE	10^8	*	0	*	*	0	0	0
	10^7	0	0	0	*	0	0	0
	10^6	0	0	0	0	0	0	0
	10^5	0	*	0	0	*	*	*

Keterangan : * : pada konsentrasi tersebut tidak diuji

OT : oksitetrasiklin

ER : eritromisin

VA : vankomisin

PE : penisilin

DO : doksisisiklin

BA : basitrasin

ME : metisilin

PEMBAHASAN

Uji kepekaan MG terhadap antibiotika dengan teknik cakram antibiogram hasilnya dapat dibaca 3 hari setelah diinkubasi dan maksimal pada hari ke-7, sedangkan teknik *micro-broth dilution* dapat dibaca paling cepat pada hari ke-5 setelah inkubasi dan maksimal pada hari ke-14. Dari faktor waktu dapat dilihat bahwa teknik kertas cakram untuk pengujian sensitivitas antibiotika lebih cepat dari pada teknik *micro-broth dilution*. Jika dilihat dari teknik pekerjaannya, uji sensitivitas dengan menggunakan kertas cakram lebih mudah dan sederhana dibandingkan dengan teknik *micro broth dilution* yang pekerjaannya memakan waktu dan sering terjadi kontaminasi jika sterilisasi lempeng mikrotiter yang digunakan kurang baik.

Menurut CLYDE (1983), untuk uji hambatan pertumbuhan diperlukan isolat dengan kepadatan koloni 10^4 - 10^6 CCU/ml. Dalam penelitian ini, kepadatan koloni isolat yang diuji berkisar 10^5 - 10^8 CCU/ml. Perhitungan sensitivitas dilakukan selain dengan jumlah koloni standar yang dianjurkan (10^5 - 10^6 CCU/ml) juga dilakukan dengan jumlah koloni yang lebih tinggi (10^7 - 10^8 CCU/ml). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kepadatan koloni terhadap keefektifan antibiotika. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi kuman MG yang digunakan makin rendah kemampuan hambatan antibiotika yang digunakan. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh WHITHEAR *et al.* (1983).

Hasil uji kepekaan MG terhadap doksisisiklin, oksitetrasiklin dan eritromisin menunjukkan bahwa masing-masing ada satu, 2 dan 3 isolat MG yang resisten, yang menunjukkan bahwa penggunaan doksisisiklin, oksitetrasiklin atau eritromisin yang sering dilakukan untuk pengobatan PPM di lapangan telah menimbulkan resistensi terhadap isolat lokal MG. Hasil resistensi isolat lokal MG terhadap doksisisiklin ini sejalan dengan penelitian yang dilaporkan oleh LIN (1987) dari Taiwan yang menyatakan bahwa daya hambat doksisisiklin terhadap isolat lokal MG di Taiwan mengalami penurunan. Resistensi mungkin diperoleh karena resistensi silang dengan khlortetrasiklin dan tetrasiklin yang telah digunakan di Taiwan selama lebih dari 20 tahun. Resistensi isolat lokal MG terhadap oksitetrasiklin juga sejalan dengan hasil penelitian COOPER *et al.* (1993). Resistensi terhadap salah satu makrolida atau tetrasiklin biasanya juga resisten terhadap semua anggota kelompok makrolida atau kelompok tetrasiklin (WHITHEAR, 1983). Resistensi isolat lokal MG terhadap eritromisin juga sejalan dengan hasil penelitian WHITHEAR *et al.* (1983), LIN (1987), TANNER dan WU (1992), bahkan pertumbuhan beberapa isolat MG ada yang tidak dihambat oleh eritromisin (BOUGHTON, 1982).

Tidak satupun isolat lokal MG yang sensitif terhadap penisilin, basitrasin atau vankomisin merupakan hasil yang tidak menyimpang. Menurut GAN dan ISTANTORO (1987), penisilin, dan metisilin golongannya menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroba, sedangkan mikoplasma diketahui tidak memiliki dinding sel (TANNER and WU, 1992). Oleh karena itu, penisilin biasanya ditambahkan pada medium biakan mikoplasma untuk mencegah kontaminasi bakteri lain dan cendawan (YODER, 1991).

Basitrasin dan vankomisin dalam penelitian ini tidak mampu menghambat pertumbuhan MG. Hal ini dapat dipahami karena basitrasin bersifat bakterisida terhadap kuman-kuman Gram positif, dan tidak aktif terhadap kuman Gram negatif. Demikian juga vankomisin hanya aktif terhadap kuman Gram positif, khususnya golongan kokus (SETIABUDY, 1987), sedangkan MG bukan merupakan kuman Gram positif.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kepekaan MG terhadap antibiotika bervariasi tergantung pada jenis isolat, kepadatan koloni dan jenis antibiotika. Penggunaan antibiotika yang sama dan dilakukan terus-menerus dapat menimbulkan resistensi. Dari sejumlah 5 isolat lokal MG yang diuji terhadap doksisisiklin, eritromisin dan oksitetrasiklin yang sering digunakan di lapangan masing-masing memperlihatkan satu, 2 dan 3 isolat lokal MG yang resisten. Isolat MG ADA7 yang diperoleh dari Australia ternyata resisten terhadap semua antibiotika yang diuji dan tidak satupun isolat lokal MG yang peka terhadap basitrasin, vankomisin, metisilin dan penisilin.

DAFTAR PUSTAKA

- BOUGHTON, E. 1982. Antibiotic sensitivities of mycoplasmas. *Vet. Rec.* 4: 541-542.
- BRADBURY, J.M., C.A. YAVARI, and C.J. GILES. 1994. *In-vitro* evaluation of various antimicrobial against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the micro-broth method, and comparison with a commercially-prepared test system. *Avian Pathol.* 23: 105-115.
- COOPER, A.C., J.R. FILLER, M.K. FULLER, P. WHITTLESONE, and D.R. WISE. 1993. *In vitro* activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasma veterinary importance. *Res. Vet. Sci.* 54: 329-334.
- CLYDE, W.A. (Jr). 1983. Growth inhibition test. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Volume I. Edit.by S. Razin and J.G. Tully. Academic Press. New York, London. pp.405 - 410.
- FREY, M.C., R.P. HANSON and D.P. ANDERSON. 1968. A medium for the isolation of avian mycoplasma. *Am. J. Vet. Res.* 29: 2164-2171.

- GAN, V.H.S. dan J.H. ISTIANTORO. 1987. Penisilin, sefalosporin dan antibiotik betalaktam lainnya. p. 563-687. In. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 3. Balai Penerbitan FKUI, Jakarta.
- JONES, R.N. 1984. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 3rd ed. *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* 4, Number 16.
- JORDAN, F.T.W. and D. KNIGHT. 1984. The minimum inhibitory concentration of kisasamycin, tylosin and tiamulin for *Mycoplasma gallisepticum* and their protective effect on infected chicks. *Avian Pathol.* 13 : 151-162.
- LIN, M.Y. 1987. *In vitro* comparison of the activity of various antibiotics and drugs against New Taiwan Isolates and standard strains of avian mycoplasma. *Avian Dis.* 31: 705-712.
- MEYNELL, G. G. and E. MEYNELL. 1975. Theory and Practice. In *Experimental Bacteriology*. p. 231-236. Cambridge University Press. London, New York. Melbourne.
- POERWADIKARTA, M.B., S. HARDJOUTOMO, dan K. BARKAH. 1993. Sensitivity of local isolates of *Bacillus anthracis* against several antibiotics. *Penyakit Hewan.* 25(46): 133-136.
- SETIABUDY, R. 1987. Antimikroba lain. p. 615-623. In. *Farmakologi and Terapi*. Edisi 3. Balai Penerbitan FKUI, Jakarta.
- SIMMONS, G.C. and J. CRAVEN. 1980. Antibiotic sensitivity test using the disc method. SCA- Animal Health Committee Sub - Committee of Principle Laboratory Officers. Australian Bureau of Animal Health. Brisbane.
- SOERIPTO. 1995. *In-vitro* evaluation of various antimicrobial agents against some local strains of *Mycoplasma gallisepticum* by micro-broth method, and comparison with an agar method. *J. Mikrobiol. Ind.* 3(1): 48-53.
- SRI POERNOMO dan S. CHOTIAH. 1994. Isolasi *Salmonella thyphimurium* dari anak kuda mati yang menderita diare dan uji kepekaannya terhadap antibiotika (studi kasus). *Penyakit Hewan* 26(48): 26-29.
- TANNER, C.A. and C.C. WU. 1992. Adaptation of the sensititre broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 36: 714-717.
- WHITHEAR, K.G. 1983. Control of chicken mycoplasma infection in Australia. Disease Prevention and Control in Poultry Production. Post Graduate Committee in Veterinary Science. University of Sydney, Sydney. pp. 251-261.
- WHITHEAR. K.G., D.D. BOWTELL, E. GHIOCAS, and K.L. HUGHES. 1983. Evaluation and use of micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis.* 27(4): 937-949.
- YODER, W.J. 1991. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: *Diseases of Poultry*. 9th ed. Edit. by Barnes, H.J., C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder. eds. Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa. pp. 198-212.